

機関番号：11301

研究種目：挑戦的研究(萌芽)

研究期間：2018～2019

課題番号：18K19830

研究課題名(和文) DNA膜モチーフによる人工膜システムの創成

研究課題名(英文) Development of Artificial Membrane System by DNA Membrane Motif

研究代表者

村田 智 (Murata, Satoshi)

東北大学・工学研究科・教授

研究者番号：10334533

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,800,000円

研究成果の概要(和文)：人工的に合成したDNA膜モチーフにより膜面を構築することを目的として、流動モザイクモデルを模して、キッシングループを介して動的に結合するDNA膜モチーフを設計した。膜モチーフ間のループ間作用を評価するために、硬い二本鎖ステムと柔らかい一本鎖ループを有するD字型モチーフやO字型モチーフを作製したが、いずれの場合も意図した多量体形成は観察されず、意図した構造体の形成は難しいことが分かった。そこで、閉鎖空間にモチーフを閉じ込めることにより構造体の形成率を高める方法を検討した。2種類のDNAオリガミ構造をマイクロ空間で形成する実験により、マイクロ空間が形成に有利に働くことが確かめられた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究では、自在に機能を設計できる人工細胞の構築に向けて、非脂質分子による膜構造の形成を試みた。分子間の動的な組み換えを意図してキッシングループ間相互作用で凝集するDNAモチーフを設計したが、熱力学的な安定性(モチーフ間の結合強度)が設計値よりかなり小さく、環状構造のトポロジカルな拘束が強く働いていることが示唆された。そこで、対象をDNAオリガミに変更し、閉鎖空間に閉じ込めることにより膜状構造体の形成率を高める方法を検討した。これにより人工膜形成を促進する環境制御の指針が得られた。膜面の機能化が容易なDNAを素材とする人工膜が実現すれば、医療応用などさまざまな用途が開けることが期待される。

研究成果の概要(英文)：Aiming at constructing artificial membrane with synthesized DNA, we designed a DNA membrane motif that dynamically binds via a kissing loop similar to the flow mosaic model. D-shaped and O-shaped motifs with a hard double-stranded stem and a soft single-stranded loop were prepared to evaluate the loop-loop interaction between membrane motifs. Although variations of motifs and various buffer condition were tested, the expected aggregation was not observed. We investigated a method to increase the formation rate of the structure by confining the motif in the closed space. As the specimen, we adopted two types of membranous DNA origami structures, which are known to be quickly formed in various conditions. As the result it was confirmed that the micro space is advantageous for the reliable formation of the structure.

研究分野：分子ロボティクス、機械工学

キーワード：DNA分子膜 人工細胞 分子ロボティクス

1. 研究開始当初の背景

生物細胞は、いろいろな生体分子やナノ構造を、細胞膜という袋で包んだものである。生物細胞の構造をまねて、人工の細胞システムを作る研究が盛んに行われている。我々の研究室では、人工脂質膜で作った容器(リポソーム)の中に、様々な機能分子を内包させた「アメーバ型分子ロボット」と呼ぶ人工細胞を開発し、その変形実験に成功している(Sato et al., Science Robotics, 2, 4, 2017)。

人工膜を構成する分子に要求される性質としては、親水性と疎水性の部分を持ち、これらが自己組織的に集合することである。さらに膜分子の形状、荷電、疎水性・親水性の度合いなどに応じて膜の性質が決まる。こうした膜の中では、個々の分子が結晶のように決まった相手と結合するのではなく、熱揺らぎのなかで常に結合する相手を組み換えている。これを流動モザイクモデルと呼ぶ。チャネルやレセプターの機能と膜の流動性は深く関係しており、膜の変形・成長・分離といった細胞分裂に不可欠な性質も、膜の流動性が生み出している。

近年、人工的に合成したDNA分子を素材に、さまざまなナノ構造や機能デバイスを作製する技術(DNAナノテクノロジー)が急速に進展しているが、人工の膜チャネルの開発はそのハイライトのひとつである。しかし、DNAは親水性で膜(脂質)親和性がないため、コレステロールなどの疎水性分子を付加しなければならず、膜への埋め込み効率がきわめて低いことが課題となっている。

2. 研究の目的

本研究では、人工的に合成したDNA分子(膜モチーフ)により人工の膜面(DNA膜)を構築することを目的とする。これまで人工の膜チャネルをDNAで作る研究はあるが、膜そのものをDNAでつくった例は皆無である。ボトムアップ設計したDNA膜が実現すれば、(1)膜厚や曲率の制御(2)膜の裏表の区別(3)DNAチャネルなどDNAナノ構造の膜への埋め込み(4)機能ラフト形成等が可能になる。(2~4)はDNA膜ではじめて可能となる性質である。これは、DNA膜の開発により人工細胞の機能を飛躍的に向上させられることを意味し、自己複製可能な人工細胞型分子ロボットの実現に向けて決定的な意味をもつ。

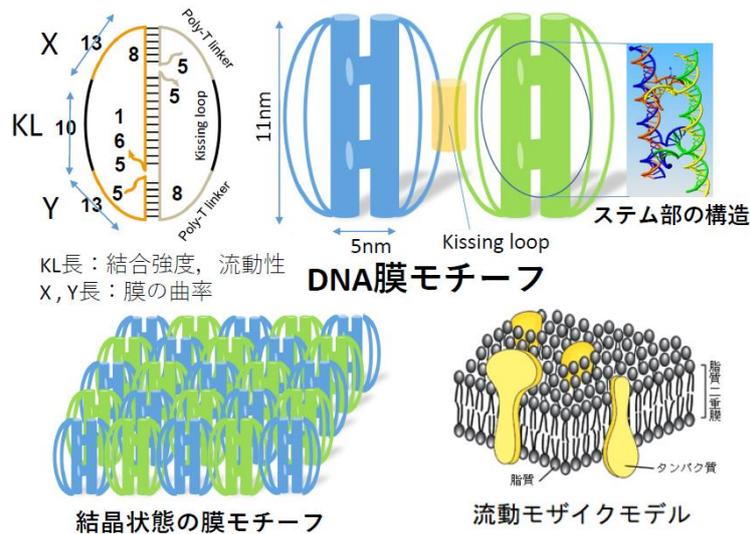
3. 研究の方法

流動モザイクモデルのように動的に結合するDNA膜モチーフの研究はこれまで全く行われておらず、きわめて挑戦的であるが、応募者の設計ノウハウを駆使すれば、十分可能であると考えた。

モチーフ設計: 予備実験をもとに、次図のような形状のモチーフを設計した。モチーフは4つの結合ループを持ち、これらが互いにKissing loopと呼ばれる結合様式で結合する。低温状態ではこれらのモチーフは結晶化するが、温度を上げることによって流動化し、フレキシブルな膜面を構成することが期待された。

結合性設計: モチーフ内のステム形成、モチーフループ間の動的結合強度などはすべてDNA塩基配列の設計による。各部位について、適当な自由エネルギーを設定し、一定の温度範囲で流動する膜面の形成を目論んだ。

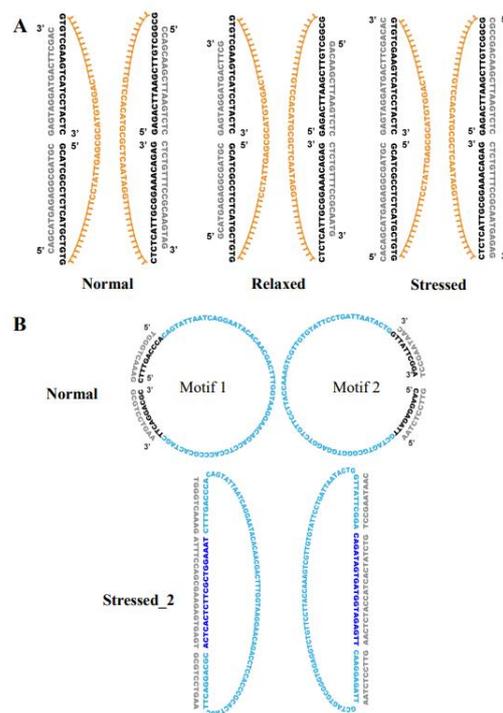
機能化設計: ループ中の結合部(KL)の位置やループの長さ(X, Y)を調節することにより、膜面に曲率を持たせる。またDNAチャネルに膜モチーフと同じコネクタを付加することでDNAチャネルを埋め込むことを考えた。



実験方法：電気泳動によるモチーフ形成確認，分光光度計によるKissing Loopのアニーリング実験，膜構造の顕微鏡観察（ドライアップ法，電顕観察），偏光板を用いた液晶観察，DLSによるモチーフ粒径測定，などを組み合わせ，膜形成を評価する。

4. 研究成果

初年度は，DNA モチーフ間のループ・ループ相互作用を実現するための基礎ステップとして，硬い二本鎖ステムと柔らかい一本鎖ループを有するD字型モチーフを設計した（右図A）．まず熱力学的シミュレーションに基づいて，配列長および塩基配列を決定した．実験的にその特性を調べるため，一本鎖部分の配列を共通として，ステム部の長さを3種類に変えた Normal, Relaxed, Stressed を合成した．これらのDNA鎖を混合し，アニーリングによりDモチーフを作製した．酵素反応（ライゲーション，エクソヌクレアーゼ，RCA）により，意図通りのモチーフが形成されていることを確認した．まず，DNA鎖の混合順序によりモチーフ同士が絡み合うものとそうでないものが作り分けられることがわかった．電気泳動による相互作用の確認を行ったところ，モチーフ2量体のバンドがごく弱くあらわれただけで，それ以外の多量体形成は確認できなかった．



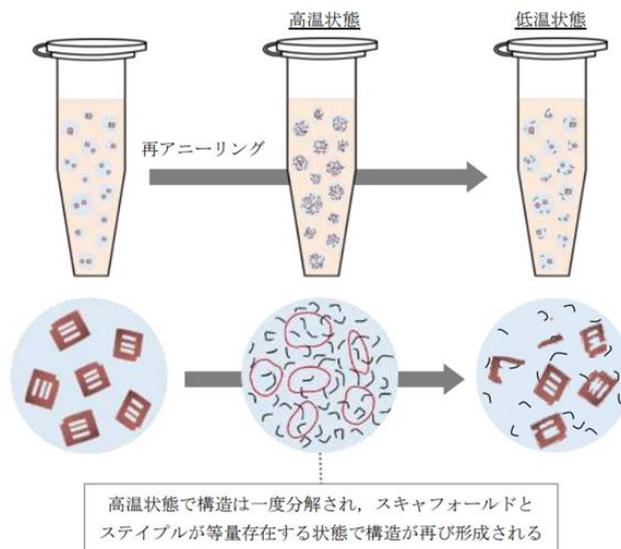
これは，そもそも多量体形成ができていないか，あるいは，結合が弱いため，ゲルの中を泳動中に多量体が壊れたと考えられる．それを確認するため，ループ相互作用の融解温度を測定したが，やはり有意な温度変化は観測されなかった．最後に，モチーフ単体および複合体の粒子径の温度変化を測定したところ，3種のモチーフの粒子径に差はなく，結果として，多量体形成が確認できなかった．

2年度は，相互作用する一本鎖部分の長さの延長，配列の工夫（G含有量等）などの設計修正に加え，モチーフ濃度・バッファー塩濃度を上げるなど，より膜形成しやすい実験条件に変更し，動的光散乱法（DLS）をもちいた粒径測定を行った．その結果，2量体までの小

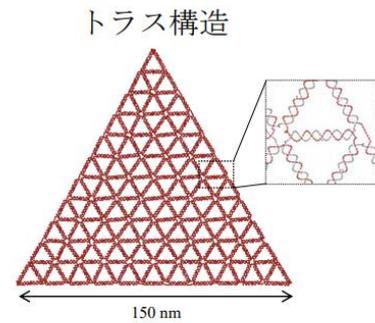
さな構造体は形成されたが、集合体の形成は観測されなかった。そこで、一本鎖ループ部分の塩基数をさらに増やし (60nt), ループ間相互作用を最大化した O 型モチーフ (同図 B) を新たに設計し, 6 通りの条件で集合体形成実験を試みたところ, 絡み数による集合体の大きさの変化は認められたものの, 構造体の形成には至らなかった。これらの結果より, モチーフ間の相互作用はループという幾何学構造により強く阻害されることがわかった。

そこで, 確実に形成することがわかっている DNA オリガミによるトラス型膜面構造に対象を変更し, その形成条件を調べる研究を行った。この構造には流動性はないが, 大きな平面をつくることができるだけでなく, さまざまな条件下でも確実に構造形成が行えるという特性がある。実験では, 比較のための通常の平行型の DNA オリガミとトラス構造型 DNA オリガミの 2 種類の DNA ナノ構造を, マイクロサイズのドロップレット内環境で作製し, 微小閉鎖空間が構造形成に与える影響を調べた。

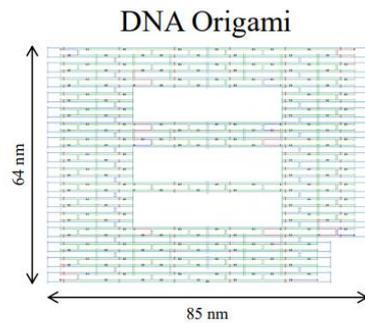
手順としては, まず別の容器でこれらのナノ構造をアニーリングにより形成し, 残留ステイプルを除去した DNA ナノ構造をドロップレット内で再アニーリングすることで, ナノ構造の土台となるスキヤフォールドと部品となる 200 種類程度のステイプルが等量存在する状況での形成を実現した (下図)。



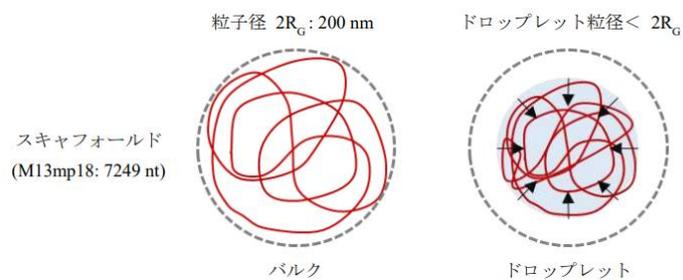
バルクとドロップレットにおける DNA ナノ構造の形成特性を調べたところ, ドロップレット内ではバルクに比べて構造が形成されやすいことが確かめられた。また, 構造の形成が難しいとされる急冷のアニーリング条件でもドロップレット内環境では構造の形成が確認された。これは, 微小空間内で DNA ナノ構造の形成反応速度が上昇した可能性を示している。さらに, 異なる粒径分布をもつドロップレット内で DNA ナノ構造を作製した場合には, ドロップレットの粒径が小さいほど, 形成率が高いという結果となり, 微小空間の体積が構造の形成に影響し, 体積が小さいほど形成に有利な環境であることが示された。



vHelixで設計したトラス構造



caDNAnoで設計したDNA Origami
形成度合を評価しやすい形状



DNA ナノ構造形成における微小閉鎖空間の効果

得られた DLS 測定結果から M13mp18 の粒子径の平均値は、25°Cでは 66.3 ± 0.35 nm (S.D.), 70°Cでは 89.9 ± 2.25 nm (S.D.)と算出された。特に、高温時には最大 200 nm 程度の粒子径となることが分かった。そのため、粒径が 200 nm 程度以下のドロップレット内では M13mp18 はドロップレットの界面から拘束を受け、DNA 鎖が本来の慣性半径よりも密な構造をとっていると予想される。また、粒径が 200 nm 以上のドロップレットにおいても、ドロップレット界面が M13mp18 の慣性半径に影響を及ぼしている可能性がある。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計7件（うち査読付論文 7件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 6件）

1. 著者名 Taiki Watanabe, Yusuke Sato, Hayato Otaka, Ibuki Kawamata, Satoshi Murata, Shin-Ichiro M Nomura	4. 巻 25-1
2. 論文標題 DNA Origami “Quick” Refolding inside of a Micron-Sized Compartment	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Molecules	6. 最初と最後の頁 1-8
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3390/molecules25010008	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -
1. 著者名 Keita Abe, Satoshi Murata	4. 巻 38
2. 論文標題 Programming methods for DNA based reaction-diffusion systems	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 New Generation Computing	6. 最初と最後の頁 379-393
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1007/s00354-020-00094-z	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -
1. 著者名 Y Suzuki, I Kawamata, K Mizuno, S Murata	4. 巻 59(15)
2. 論文標題 Large Deformation of a DNA-Origami Nanoarm Induced by the Cumulative Actuation of Tension-Adjustable Modules	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Angewandte Chemie (International ed. in English)	6. 最初と最後の頁 6230-6234
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1002/anie.201916233	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -
1. 著者名 T Hosoya, I Kawamata, MN Shin-ichiro, S Murata	4. 巻 37 (1)
2. 論文標題 Pattern formation on discrete gel matrix based on DNA computing	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 New Generation Computing	6. 最初と最後の頁 97-111
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1007/s00354-018-0047-1	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

1. 著者名 S Murata, I Kawamata, Y Suzuki	4. 巻 None
2. 論文標題 Developing Students Abilities by Design Competition	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 JSEE Annual Conference 2019, International Session Proceeding	6. 最初と最後の頁 1-6
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.20549/jseen.2019.0_68	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Y Sato, K Komiya, I Kawamata, S Murata, MN Shin-ichiro	4. 巻 55 (62)
2. 論文標題 Isothermal amplification of specific DNA molecules inside giant unilamellar vesicles	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Chemical Communications	6. 最初と最後の頁 9084-9087
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1039/c9cc03277k	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 K Abe, I Kawamata, MN Shin-ichiro, S Murata	4. 巻 4 (3)
2. 論文標題 Programmable reactions and diffusion using DNA for pattern formation in hydrogel medium	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Molecular Systems Design & Engineering	6. 最初と最後の頁 639-643
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1039/C9ME00004F	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計5件 (うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件)

1. 発表者名 内田健央, 川又生吹, 野村慎一郎, 村田智
2. 発表標題 相互作用力が調整可能なDNAモチーフの幾何学設計
3. 学会等名 第2回分子ロボティクス年次大会 (東京工業大学)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 遠藤佑真, 川又生吹, 野村慎一郎, 村田智
2. 発表標題 キッキングループ相互作用によるDNAモチーフの構造化
3. 学会等名 第2回分子ロボティクス年次大会 (東京工業大学)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 遠藤 佑真 (東北大学)、内田 健央、川又 生吹、鈴木 勇輝、野村 M. 慎一郎、村田 智
2. 発表標題 脂質膜上に形成した2次元DNAナノ構造の評価
3. 学会等名 第1回分子ロボティクス年次大会 (東北大学)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 渡辺泰基 (東北大学)、村田智、野村慎一郎、川又生吹、鈴木勇輝
2. 発表標題 DNAナノ構造形成における微小空間の効果に関する研究
3. 学会等名 第1回分子ロボティクス年次大会 (東北大学)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 武田祐貴 (東北大学)、鈴木勇輝、川又生吹、野村慎一郎、村田智
2. 発表標題 複数の自己集合モードを持つDNAオリガミ構造体の設計と構築
3. 学会等名 第1回分子ロボティクス年次大会 (東北大学)
4. 発表年 2018年

〔図書〕 計1件

1. 著者名 分子ロボティクス研究会著, 村田智編	4. 発行年 2019年
2. 出版社 CBI学会出版	5. 総ページ数 302
3. 書名 分子ロボティクス概論～分子のデザインでシステムをつくる	

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究 分担 者	川又 生吹 (Kawamata Ibuki) (30733977)	東北大学・工学研究科・助教 (11301)	